

(19) REPUBLIQUE FRANCAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 697 851

(21) N° d'enregistrement national : 92 13562

(51) Int Cl⁵ : C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 10.11.92.

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite : BIO
MERIEUX — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Gruters Rob, Cleuziat Philippe, Bonnici
Françoise et Mallet François.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 13.05.94 Bulletin 94/19.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(74) Mandataire : Cabinet Nony et Cie.

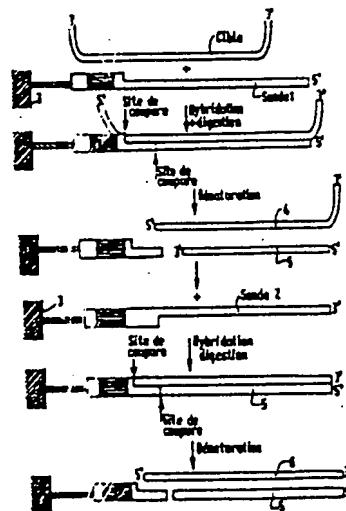
(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

AMI INFORMATION SERVICES
P O BOX 405, CORTE MADERA, CA 94976-0405
(415) 927-0340 • FAX (415) 927-7250

(54) Système et procédé de détection d'une séquence d'acide nucléique selon une méthode d'amplification par
restriction enzymatique sur phase solide.

(57) Système de détection d'une séquence d'acide nucléique cible selon une méthode d'amplification par restriction enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend un ensemble de deux sondes nucléiques (1, 2) partiellement double brin fixées sur un support solide (3), lesdites sondes comprenant un premier brin qui contient la séquence du site de reconnaissance d'une endonucléase et qui s'étend jusqu'au site de coupure dudit premier brin par ladite endonucléase, et un second brin comprenant une partie complémentaire dudit premier brin s'étendant depuis au moins ledit site de reconnaissance jusqu'au site de coupure du premier brin, ce second brin se prolongeant au-delà dudit site de coupure par une partie simple brin, ladite partie simple brin étant, pour l'une des sondes (ou première sonde) (1) sensiblement complémentaire de la séquence d'acide nucléique cible, et pour l'autre sonde (ou seconde sonde) (2) sensiblement complémentaire, et de préférence parfaitement complémentaire du produit de clivage simple brin de ladite première sonde par ladite endonucléase, lesdites parties simple brin desdites sondes ayant une extrémité libre 3' pour l'une des sondes et 5' pour l'autre sonde.

Ce système, mis en contact avec un milieu liquide contenant la cible et l'endonucléase, permet la détection de la cible en réalisant une amplification.



FR 2 697 851 - A1



La présente invention a pour objet un système et un procédé pour la détermination de la présence de séquences d'acide nucléique cibles selon une méthode d'amplification par restriction enzymatique sur phase solide. En particulier, la présente invention consiste en une méthode pour le dosage ou la détection d'une séquence d'acide nucléique cible spécifique au sein d'un échantillon contenant une quantité inconnue de ladite séquence, et fait référence à différents types de sondes nucléiques pour une telle méthode.

Il est souvent nécessaire, dans les technologies relatives aux acides nucléiques et au matériel génétique, de déterminer si un gène, une partie de gène ou une séquence nucléotidique est présente chez un organisme vivant ou un extrait cellulaire du matériel génétique de cet organisme. Puisque n'importe quel gène ou partie de gène est, en théorie, une séquence spécifique de bases nucléotidiques formant tout ou partie d'une molécule nucléotidique, il est possible de rechercher directement la présence d'une séquence nucléotidique spécifique au sein d'un échantillon contenant des polynucléotides.

L'intérêt de la recherche de séquences nucléotidiques spécifiques est immense pour la détection d'organismes pathogènes, la détermination de la présence d'allèles, la détection de la présence de lésions dans un génome hôte et la détection de la présence d'un ARNm particulier ou de la modification d'un hôte cellulaire, ne serait-ce que pour donner quelques exemples illustratifs. Les maladies génétiques telles que la maladie de Huntington, la myopathie de Duchenne, la phénylcétonurie et la β -thalassémie peuvent être diagnostiquées par le biais de l'analyse de l'ADN des individus. De plus, le diagnostic ou l'identification des virus, viroïdes, bactéries, champignons, protozoaires ou quelque autre forme de vie végétale ou animale peut être réalisé par des expériences d'hybridation avec des sondes nucléiques.

Différents types de méthodes de détection des acides nucléiques sont décrits dans la littérature. Ces méthodes, et particulièrement celles qui requièrent la détection de polynucléotides, reposent sur les propriétés d'appariement purine-pyrimidine des brins complémentaires d'acides nucléiques dans les duplex ADN-ADN, ADN-ARN et ARN-ARN. Ce processus d'appariement s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogène entre les bases adénosine-thymine (A-T) et guanosine-cytosine (G-C) de l'ADN double brin; des paires de bases adénosine-uracile (A-U) peuvent également se former par liaison hydrogène dans les duplex ADN-ARN ou ARN-ARN. L'appariement de brins d'acides nucléiques pour la détermination de la présence ou de l'absence d'une molécule d'acide nucléique donnée est communément désignée par "l'hybridation d'acides nucléiques" ou simplement par "hybridation".

Diverses méthodes d'amplification se sont développées afin d'accroître la puissance de détection par ces techniques d'hybridation. Le processus d'amplification peut intervenir à différents stades d'un procédé de détection par sondes nucléiques. Ces stades peuvent être classés en trois catégories : l'amplification de cible, de sonde ou de signal.

L'amplification de cible consiste à multiplier de manière spécifique un fragment d'acide nucléique présent dans un échantillon. Elle permet d'augmenter considérablement le nombre de copies d'une séquence nucléique cible à détecter.

La méthode la plus utilisée est la "Polymerase Chain Reaction" (PCR), technique d'amplification de cible qui repose sur la répétition de cycles de synthèse d'ADN *in vitro* par extension d'amorces nucléotidiques hybridées sur la séquence cible.

Une autre technique d'amplification de cible est par exemple la "Self-Sustained Sequence Replication" (3SR), (brevet International WO 90/06995) qui utilise l'association de trois enzymes : la transcriptase inverse, la RNase H et l'ARN polymérase T7.

Son principe de base repose sur un cycle continu de réactions de transcription inverse et de transcription afin de répliquer une cible d'ARN par l'intermédiaire d'ADNc.

Néanmoins, ces techniques possèdent des limitations importantes. La PCR par exemple nécessite la réalisation de nombreux cycles de températures, ce qui constitue un inconvénient majeur pour l'automatisation de la technique. De plus, elle présente de nombreux risques de faux positifs dus à sa sensibilité. Une technique telle que la 3SR présente l'avantage d'être isotherme, mais est moins sensible et requiert de nombreuses activités enzymatiques. Elle est donc, d'une part, coûteuse sur le plan des réactifs et, d'autre part, difficile à optimiser, étant donné le nombre d'activités enzymatiques requises (trois ou plus) pour sa réalisation.

La présente invention permet de remédier aux inconvénients précités. Elle permet de détecter de manière sensible la présence d'une séquence d'acide nucléique par le biais d'un système d'Amplification par Restriction sur Phase Solide (ARPS). Il est bien connu en soi que les enzymes de restriction ou "endonucléases" réalisent le clivage de la structure double-brin à l'intérieur d'une molécule d'ADN. Ces enzymes sont prévalentes chez les bactéries. Le clivage de l'ADN s'effectue en des sites spécifiques à l'intérieur de, ou adjacents au site de reconnaissance de l'enzyme. Plus de 500 enzymes de restriction ont été isolées à l'heure actuelle. Ces enzymes de restriction ont été caractérisées par rapport aux séquences d'acides nucléiques que les enzymes reconnaissent et par rapport à leur spécificité de clivage. La majorité des enzymes de restriction ou endonucléases reconnaissent une séquence de 4 à 6 nucléotides en longueur, mais certaines possèdent un site de reconnaissance de 7 à 8 bases.

L'utilisation des enzymes de restriction sur leurs sites de clivage spécifiques est bien connue. Les enzymes sont utilisées pour la cartographie de l'ADN, le clonage, et la caractérisation de séquences d'ADN. Elles ont été utilisées dans de nombreux procédés utilisant les sondes nucléiques. Le brevet européen N° 0 234 781 décrit une méthode de clivage "universelle" d'un fragment d'acide nucléique simple brin, à l'aide d'un adaptateur oligonucléotidique mimant le site de reconnaissance d'une endonucléase de restriction. De même, le brevet N° 4 683 194 des Etats Unis d'Amérique décrit une méthode de mise en évidence de la présence ou de l'absence d'un site de restriction spécifique dans une séquence d'acide nucléique, par hybridation avec une sonde nucléique complémentaire d'un des brins de l'acide nucléique et recouvrant le site de restriction. La séquence hybridée est ensuite clivée par une endonucléase et les produits coupés ou non coupés sont séparés par électrophorèse sur gel, puis détectés par le biais du marquage de cette sonde. D'une manière similaire, le brevet Européen N° 0 455 517 déposé par Oncor Inc. décrit une méthode plus sensible de détection par digestion à l'aide d'endonucléases de type II (on rappelle qu'une endonucléase de type II

reconnaît un site particulier et coupe l'acide nucléique dans ce site ou à proximité de ce site). L'introduction dans le milieu réactionnel d'un second oligonucléotide afin de recycler la séquence cible permet d'augmenter l'intensité du signal dû à la sonde oligonucléotidique clivée. Néanmoins, bien que la technique mentionnée permette de détecter d'une manière plus sensible 5 la présence d'une cible présentant un site de restriction, la méthode n'est pas très puissante. Elle induit en effet une augmentation linéaire du signal qui nécessiterait une longue durée de réaction enzymatique pour être conséquente. Cette durée d'incubation est incompatible avec la durée de vie des enzymes de restriction et nécessiterait des quantités importantes d'enzymes, augmentant ainsi énormément le prix de revient d'une expérience. De plus, la mise en évidence de la 10 restriction de l'ADN cible doit ensuite être réalisée par séparation de la sonde clivée et de la sonde non clivée. Les méthodes de séparation envisagées, telles que l'électrophorèse, sont longues à mettre en oeuvre et retardent encore d'autant le temps d'établissement d'un résultat.

La présente invention a l'avantage de permettre une détection rapide, sensible et non radioactive d'une séquence d'acide nucléique à l'aide d'une méthode d'hybridation et de 15 restriction enzymatique en phase homogène. Elle utilise, comme la technique précédente, une enzyme de restriction. Néanmoins, contrairement à la technique précédente, elle utilise une enzyme de restriction de type II qui coupe à l'extérieur de son site de reconnaissance, et sur une séquence quelconque, située à une distance déterminée par rapport au site de reconnaissance. De 20 telles enzymes ont été utilisées afin de couper un ADN cible simple brin spécifiquement sur n'importe quelle séquence (brevet Européen N° 0 234 781) en hybridant une séquence complémentaire de l'ADN cible. Il est donc possible, suite à la restriction par une telle endonucléase, de déterminer la présence d'un ADN cible, quelle que soit sa séquence nucléotidique. De plus, une même enzyme peut être utilisée afin de mettre en évidence n'importe quel ADN cible, ce qui permet d'optimiser et de comparer les résultats à des fins quantitatives.

La présente invention utilise deux sondes de capture partiellement double brin qui sont 25 immobilisées sur une phase solide. La première sonde est sensiblement complémentaire d'une séquence de l'acide nucléique cible et l'autre sonde est complémentaire de la première. L'utilisation conjuguée de ces deux types de sondes dans un même essai permet un clivage exponentiel des sondes de capture, conduisant à une amplification importante du signal à partir 30 d'une copie d'acide nucléique cible hybridé sur une sonde de capture (Figure 1). La présente invention permet le recyclage d'un brin d'acide nucléique clivé par une endonucléase de restriction de type II par hybridation du fragment clivé sur la sonde de capture complémentaire. La méthode proposée permet donc une détection hautement sensible, fiable et rapide de la 35 présence d'un brin d'acide nucléique dans un échantillon biologique. Elle possède l'avantage d'être isotherme, donc facilement automatisable, de n'utiliser qu'une seule enzyme, donc facilement optimisable, et de ne présenter qu'un coût réduit. L'utilisation d'une endonucléase de type II dont le site de clivage est distinct du site de reconnaissance permet de réaliser la détection de n'importe quelle séquence d'acide nucléique, la spécificité de restriction étant conférée par la 40 séquence des sondes de capture. L'intérêt des sondes de capture fixées sur phase solide est de permettre la discrimination rapide des produits clivés des sondes initiales sans avoir recours aux

méthodes traditionnelles de séparation électrophorétique ou chromatographique difficiles et longues à mettre en oeuvre.

L'invention a donc pour objet un système de détection d'une séquence d'acide nucléique cible selon une méthode d'amplification par restriction enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend un ensemble de deux sondes nucléiques partiellement double brin fixées sur un support solide, lesdites sondes comprenant un premier brin qui contient la séquence du site de reconnaissance d'une endonucléase et qui s'étend jusqu'au site de coupure dudit premier brin par ladite endonucléase, et un second brin comprenant une partie complémentaire dudit premier brin s'étendant depuis au moins ledit site de reconnaissance jusqu'au site de coupure du premier brin, ce second brin se prolongeant au-delà dudit site de coupure par une partie simple brin, ladite partie simple brin étant, pour l'une des sondes (ou première sonde) sensiblement complémentaire de la séquence d'acide nucléique cible, et pour l'autre sonde (ou seconde sonde) sensiblement complémentaire, et de préférence parfaitement complémentaire du produit de clivage simple brin de ladite première sonde par ladite endonucléase, lesdites parties simple brin desdites sondes ayant une extrémité libre 3' pour l'une des sondes et 5' pour l'autre sonde, et ladite endonucléase étant une endonucléase de restriction de type II à site de fixation double brin et à coupure protubérante, et dont le site de clivage est situé à l'extérieur du site de reconnaissance.

Compte-tenu du fait que l'endonucléase utilisée agit avec formation d'une coupure protubérante, il est évident que les parties monobrin des deux sondes seront de longueurs inégales, la différence de longueur étant égale à la longueur du segment situé entre le point de clivage, par l'endonucléase, de l'un des brins et le point de clivage de l'autre brin, lorsque l'endonucléase clive un acide nucléique double brin.

De préférence, la partie monobrin de la sonde ayant la partie monobrin la plus courte comporte au moins 6 nucléotides. Généralement, la partie monobrin des deux sondes comporte au plus 100 nucléotides.

L'invention a également pour objet un procédé pour détecter la présence d'une séquence d'acide nucléique cible dans un échantillon, en milieu liquide, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de l'échantillon, avec le système de sondes tel que défini précédemment, et avec l'endonucléase, l'incubation à une température appropriée pendant un temps suffisant pour permettre le recyclage des fragments clivés par l'endonucléase jusqu'à l'obtention du taux d'amplification souhaité, et la détection, selon les méthodes usuelles, du clivage des sondes de capture résultant de l'hybridation de la séquence cible lorsque celle-ci était présente dans l'échantillon.

De préférence, on opère à une température constante, voisine de la température d'activité optimale de l'endonucléase.

On comprend que la séquence-cible s'hybride avec la partie monobrin de l'une des sondes (sonde 1), ce qui permet le clivage sous l'action de l'endonucléase. Ce clivage fournit deux fragments dont l'un, issu du clivage de la cible, peut à nouveau se fixer sur une sonde 1 intacte, en initiant un nouveau cycle, et dont l'autre est complémentaire de la partie monobrin de l'autre sonde (sonde 2) et peut donc s'hydrier avec ladite sonde 2, ce qui déclenche le clivage de

ladite sonde 2. Ce dernier clivage fournit un fragment recyclable sur une autre sonde 2, et un second fragment sensiblement identique à la séquence cible et donc recyclable sur une autre sonde 1. On obtient ainsi une amplification exponentielle de séquences analogues à la cible et de séquences complémentaires de la cible issues des clivages successifs des sondes 1 et 2. Lorsque 5 la cible est un ADN comportant deux brins complémentaires, le phénomène est encore accéléré car, comme on peut facilement le vérifier, le brin complémentaire donne lieu à des réactions cycliques analogues, avec la sonde 2 jouant le rôle de la sonde 1, et vice versa. Bien entendu, la partie monobrin de la sonde 1 n'est pas nécessairement strictement complémentaire de la cible: il suffit qu'elles soient suffisamment complémentaires pour pouvoir s'hybrider dans les 10 conditions du procédé. Ainsi, une même sonde pourra éventuellement être utilisée pour détecter une séquence cible ou une séquence voisine mutée. La même remarque s'applique également à la sonde 2. Les sondes peuvent être fixées sur le support solide soit par fixation passive, soit par covalence, selon les méthodes connues. Elles peuvent également être fixées par covalence à un ligand ayant une bonne affinité pour le support solide. La fixation par covalence sur le support 15 solide peut être effectué par l'intermédiaire d'un agent de couplage, qui peut également jouer le rôle de bras espaceur.

Pour détecter si la réaction d'amplification a bien eu lieu, on peut soit rechercher la 20 présence dans la phase liquide de fragments issus du clivage des sondes, soit évaluer la quantité de sondes clivées (ou de sondes intactes) sur le support solide. Pour cela, on peut, dans le premier cas, rechercher lesdits fragments dans la phase liquide par exemple selon un test classique d'hybridation sandwich à l'aide d'une sonde de capture appropriée et d'une sonde de 25 détection marquée. Dans le second cas, on peut par exemple, à la fin de la réaction d'amplification, mettre le support solide (après rinçage), en contact avec une sonde marquée appropriée (complémentaire de la partie monobrin de l'une des deux sondes fixées, par exemple la sonde 1), et, par comparaison du signal obtenu avec celui obtenu avec ladite sonde marquée et ledit support solide avant la réaction d'amplification, déterminer la proportion de sondes 1 intactes fixées restantes ou bien la diminution de la quantité de sondes 1 intactes fixées. On peut en outre, si on le désire, vérifier la proportion de clivage sur l'autre sonde (sonde 2). Normalement, les quantités de sondes 1 et 2 clivées doivent être sensiblement les mêmes.

30 L'acide nucléique cible est de préférence soumis à une opération préalable de dénaturation, cette étape étant bien entendu obligatoire lorsque la cible est un ADN double brin.

La présente invention propose donc notamment un procédé de détection de la présence d'une séquence d'acide nucléique à partir d'un échantillon biologique, ledit procédé comprenant les étapes de :

35 (a) fixation de séquences oligonucléotidiques partiellement double brin dites sondes de capture, sur une phase solide. Ces séquences sont, l'une sensiblement complémentaire d'une partie de la séquence cible dont on veut détecter la présence, et l'autre sensiblement identique à ladite séquence cible, et elles contiennent en outre un site de reconnaissance d'une endonucléase de type II. Les deux types de sonde de capture doivent être fixées sur phase solide, afin de 40 permettre une amplification exponentielle du signal. La partie complémentaire de la séquence

cible, ainsi que la partie sensiblement identique à la cible, doivent être simple brin, tandis que la région de fixation de l'endonucléase est double brin.

(i) l' obtention de la structure double brin peut être réalisée notamment de deux façons indépendamment du mode de fixation ultérieure sur support solide.

5 1 - une première voie fait intervenir un fragment d'acide nucléique sous la forme d'un dérivé résultant du couplage covalent en position terminale 5' ou 3' dudit fragment d'acide nucléique avec un ligand ayant une masse moléculaire inférieure à 5000 et comprenant au moins un groupement fonctionnel polaire, étant entendu que lorsque ledit ligand est un nucléotide ou un oligonucléotide, il comprend au moins un nucléotide modifié de façon à introduire ledit groupement fonctionnel polaire. Ce dérivé est ensuite hybride avec un fragment d'acide nucléique plus long ou plus court et complémentaire dans la région formant un duplex. Le complexe ainsi obtenu, et comprenant une région duplex homologue, est ensuite fixé sur support solide.

10 15 2 - une deuxième voie de formation dudit complexe d'acide nucléique comporte le couplage covalent de deux groupements pentaéthylèneglycols séparés par un groupement aminohydroxy, 3-propanediol-1,2 entre les deux fragments d'acides nucléiques. Les deux fragments d'acides nucléiques sont choisis de telle façon que le plus petit d'entre eux soit complémentaire de l'extrémité 5' ou (exclusif) 3' du grand fragment d'acide nucléique, conduisant ainsi à la formation d'un homoduplex. Ladite voie de formation présente l'avantage d'orienter la fixation desdites sondes de capture par leur côté correspondant à leur région homoduplex.

20 (ii) l'immobilisation des structures oligonucléotidiques partiellement double brin sur support solide peut être obtenue par exemple selon l'une des approches suivantes :

25 1 - fixation passive sur un support solide d'un complexe de fragments d'acides nucléiques comportant moins de 100 nucléotides, sur lequel on met en contact ledit support avec ledit complexe sous forme d'un dérivé résultant du couplage covalent dudit complexe avec un ligand ayant une masse moléculaire inférieure à 5000 et comprenant au moins un groupement fonctionnel polaire, ledit dérivé n'étant pas susceptible de réagir sur ledit support avec formation d'une liaison covalente dans les conditions dudit contact, étant entendu que lorsque ledit ligand est un nucléotide ou un oligonucléotide, il comprend au moins un nucléotide modifié de façon à introduire ledit groupement fonctionnel polaire (Demande de brevet Français N° 91 09057 du 17 juillet 1991). Le groupement fonctionnel est choisi notamment parmi les groupements amine, hydroxy, amido, carbamoyle, alkylthio, arylthio. Le ligand est notamment un composé comprenant au moins un groupement hydrophobe.

30 35 2 - fixation sur un support solide par liaison covalente. Le complexe de fragments d'acides nucléiques sous la forme d'un dérivé résultant du couplage covalent dudit complexe avec un ligand comprenant au moins un groupement fonctionnel polaire, ledit dérivé étant susceptible de réagir sur ledit support avec formation d'une liaison covalente. Cette réaction d'une fonction réactive déterminée présente sur le support et la fonction réactive dudit dérivé se faisant en présence ou en absence d'un réactif de couplage.

(b) adjonction de l'échantillon supposé contenir la séquence cible dénaturée par traitement adéquat (thermique ou alcalin), et de l'endonucléase de restriction de type II telle que *Alw* I, *Bbs* I, *Bbv* I, *Bcg* I, *Bpm* I, *Bsa* I, *Bsg* I, *BsmA* I, *BspM* I, *Ear* I, *Fok* I, *Hga* I, *Hph* I, *Mbo* II, *Mnl* I, *Ple* I, ou *SfaN* I (liste évidemment non limitative), clivant la sonde de capture si la région duplex est reconstituée lors de l'hybridation d'une séquence cible dénaturée sur la partie monobrin de la sonde de capture.

(c) incubation de la réaction ainsi constituée à une température appropriée pour l'activité de l'endonucléase et l'hybridation sélective d'une séquence cible sur sa sonde de capture, pendant une durée pouvant aller par exemple jusqu'à trois heures. La séquence cible ainsi définie fait référence à un brin d'acide nucléique monocaténaire n'ayant pas subi de restriction ni induit la restriction de la sonde de capture. Ainsi donc, ladite séquence cible possède une région d'hybridation plus longue que la dite séquence ayant subi une telle restriction. Il en résulte une différence de stabilité thermodynamique suffisante permettant la séparation, dans les conditions données, du brin d'acide nucléique cible clivé, ainsi que de la sonde de capture clivée, et réinitiation de la réaction sur des sondes de capture en grand excès molaire.

(d) détection des fragments d'acides nucléiques résultant du clivage de la sonde de capture clivée suite à l'hybridation de la séquence cible sur ladite sonde de capture. Ladite détection des fragments d'acides nucléiques ainsi libérés en solution s'effectue par séparation de la phase solide de la phase liquide et analyse de la phase liquide grâce à un système de capture/détection sur une deuxième phase solide, faisant intervenir un système de sondes froides marquées à l'aide d'enzymes marqueurs telles que la phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de détection d'une séquence d'acide nucléique comprenant:

(a) éventuellement la dénaturation d'une séquence d'acide nucléique cible, notamment lorsqu'il s'agit d'une séquence double brin, en présence d'un système de deux sondes tel que défini précédemment, l'une des sondes étant liée à un marqueur ;

(b) l'adjonction d'une enzyme de restriction au mélange réactionnel ;

(c) la réalisation d'une réaction d'hybridation à une température adéquate permettant à l'endonucléase de restriction de cliver les duplex d'ADN reconstitués, conduisant ainsi à la libération des fragments simple brin marqués issus des sondes de capture ;

(d) et la détection des fragments clivés marqués dans le milieu liquide, ou des sondes marquées intactes sur le support solide.

Le procédé de détection de l'invention comprend en particulier:

(a) l'hybridation d'une molécule cible permettant la formation d'un duplex sonde-cible reconstituant le site de clivage d'une endonucléase de restriction en présence d'un ensemble de deux types de sondes de capture telles que précédemment décrites, fixées sur un support solide, conduisant au clivage desdites sondes de manière exponentielle par une endonucléase de restriction, si une molécule d'acide nucléique cible est présente dans le milieu réactionnel.

(b) le clivage de duplex d'ADN immobilisés sur support solide par une endonucléase de restriction.

(c) le recyclage des fragments d'acides nucléiques résultant du clivage des sondes de capture, par hybridation sur les sondes de capture intactes en excès, suivie du clivage desdites sondes de capture par ladite endonucléase de restriction.

5 (d) la détection des oligonucléotides résultant du clivage des sondes de capture.

Le procédé d'amplification peut être réalisé à partir d'acides nucléiques cibles purifiés ou non purifiés, simple brin ou double brin, ou à partir d'un mélange d'acides nucléiques, à condition que lesdits acides nucléiques soient de qualité suffisante pour être digérés par une 10 endonucléase de restriction, dans des conditions standards comme décrit par Sambrook *et al.* dans *Molecular Cloning* (1989). Les sources d'acides nucléiques peuvent être des prélevements biologiques divers réalisés chez l'homme, les animaux et les plantes. Les microorganismes, notamment les bactéries, les levures, les virus, peuvent également constituer des sources d'acides nucléiques analysables à l'aide de la présente invention.

15 La température à laquelle la réaction doit être réalisée pourra varier en fonction du type d'endonucléase utilisée. En tenant compte de la composition (GC%) des sondes de captures définies pour un essai, on peut déterminer théoriquement, selon les méthodes connues, ou à l'aide d'expériences de routine, la longueur des sondes qui permettra d'opérer à la température choisie. La majorité des enzymes de restriction possède une activité optimale à 37°C, mais d'autres 20 présentent l'avantage de travailler à plus haute température. Par exemple, l'endonucléase *Bsa* I utilisée dans les exemples 1 à 3 possède une température optimale de 55°C. L'utilisation d'une telle enzyme implique de définir des sondes de capture de longueur plus importante, permettant un appariement stable de la molécule d'acide nucléique cible sur ladite sonde à la température donnée. La température de réaction doit, en effet, dans un milieu réactionnel de concentration 25 saline adéquate, permettre une hybridation stable de la cible sur la sonde de capture, et la dissociation du duplex cible-sonde une fois clivé par l'endonucléase utilisée.

Le temps de réaction peut varier en fonction de la composition du tampon réactionnel, de la concentration de sonde de capture et de cible, de la stringence du milieu réactionnel, de la longueur des sondes de capture et du type d'endonucléase utilisé. Il est important de choisir une 30 durée d'incubation suffisante pour que le processus de recyclage des sondes, qui s'opère théoriquement de façon exponentielle, puisse produire une importante quantité de sondes clivées à partir d'un faible nombre de copies d'acide nucléique cible. Le temps de réaction est généralement de 1 à 3 heures. On peut déterminer dans chaque cas, par des expériences de routine, le temps permettant d'obtenir un taux d'amplification déterminé.

35 Le terme "fragment d'acide nucléique" tel qu'utilisé dans la présente demande désigne un fragment d'ADN ou d'ARN naturel ou un oligonucléotide naturel ou de synthèse ou un fragment d'ADN ou d'ARN de synthèse non modifié ou comprenant une ou plusieurs bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2, 6-purine, la bromo-5-désoxyuridine, la pseudouridine, la 40 pseudoisocytidine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation.

Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un fragment d'acide nucléique pour une utilisation dans des tests diagnostiques, en chromatographie d'affinité et dans des processus de séparation. Des matériaux naturels, de synthèse, poreux ou non, magnétiques ou non, modifiés ou non chimiquement peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ; des polymères tels que le chlorure de vinyle, polyéthylène, polystyrènes, polyacrylate ou copolymères tel que polymère de chlorure de vinyle et de propylène, polymère de chlorure de vinyle et acétate de vinyle ; copolymères à base de styrènes ; des fibres naturels telles que le coton et des fibres synthétiques telles que le nylon; des céramiques; de la silice.

Les supports solides utilisés dans la présente invention sont un polymère de polystyrène, un copolymère butadiène-styrène ou un copolymère butadiène-styrène en mélange avec un ou plusieurs polymères ou copolymères choisis parmi le polystyrène, les copolymères styrène-acrylonitrile ou styrène-méthylméthacrylate de méthyle, les polypropylène, les polycarbonates ou analogues. Avantageusement, les supports de la présente invention sont un polystyrène ou un copolymère à base de styrène comprenant entre 10 et 90 % en poids de motifs de styrène ou de la silice. Les supports solides selon l'invention peuvent être, sans limitation, sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une feuille, d'un cône, d'un tube, d'un puits, de billes ou analogue.

Le terme "agent de couplage", tel qu'utilisé ici désigne une molécule contenant au moins deux "extrémités" ou groupements réactifs. L'agent de couplage peut être homobifonctionnel ou hétérobifonctionnel.

Les ligands utilisés dans la présente invention peuvent être des composés disponibles dans le commerce ou des composés synthétisés selon des méthodes connues en soi.

Un autre objet de la présente invention est de fournir un kit pour le diagnostic de maladies variées, en utilisant la méthode décrite précédemment. Un tel kit comprend notamment une pluralité de supports solides sur lesquels sont fixés les deux sondes, et éventuellement, dans des conteneurs appropriés, l'endonucléase, des solutions tampons, etc...

La Figure 1 est une représentation schématique du principe de la présente invention, qui constitue une méthode d'Amplification par Restriction sur Phase Solide (ARPS).

On voit sur la Figure 1 qu'après hybridation de la cible avec la sonde 1 fixée sur le support 3, et digestion par BsaI, on obtient un fragment 4 recyclable sur une sonde 1 et un fragment 5 capable de s'hybrider avec la sonde 2 pour former un duplex dont la digestion pour BsaI fournit un fragment 6 recyclable sur une sonde 1 et le fragment 5 libéré et à nouveau recyclable sur une sonde 2.

La Figure 2 est une représentation des différents complexes oligonucléotidiques et réactions utilisés dans la partie expérimentale ci-après.

La Figure 3A est une photographie d'un gel d'acrylamide non dénaturant coloré au bromure d'ethidium, mettant en évidence les différents échantillons et combinaisons d'oligonucléotides utilisés dans la partie expérimentale (exemple 1).

La Figure 3B et la Figure 3C correspondent aux résultats obtenus (exemple 1) à la suite de l'électrotransfert sur membrane de nylon des échantillons analysés sur gel de polyacrylamide (Figure 3A), et leur révélation par hybridation sélective à l'aide de sondes nucléiques marquées par la peroxydase de raifort.

5 La Figure 4A est une photographie d'un gel d'acrylamide dénaturant coloré au bromure d'éthidium de plusieurs échantillons utilisés dans l'exemple 1 ci-après.

10 La Figure 4B et la Figure 4C correspondent aux résultats obtenus à la suite de l'électrotransfert sur membrane de nylon des échantillons analysés sur gel de polyacrylamide (Figure 4A), et de leur révélation par hybridation sélective à l'aide de sondes nucléiques marquées par la peroxydase de raifort.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLES

Exemple 1:

15 Dans cet exemple, la coupure par l'enzyme de restriction *Bsa* I a été étudiée sur différents complexes nucléiques susceptibles d'intervenir dans la réaction d'amplification faisant l'objet de la présente invention.

20 Oligonucléotides utilisés:

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés sur un appareil automatique Applied biosystem 381A en utilisant la chimie des phosphoramidites, selon un procédé précédemment décrit dans le brevet WO 91/19812.

25 Les 5 oligonucléotides suivant ont été utilisés pour former les différents complexes sur lesquels a été testée l'activité de l'enzyme de restriction *Bsa* I:

L'oligonucléotide (1) est constitué de la séquence 5'

GCTGCTGCTGCTGCTGGTCTCC 3' (25 mer).

L'oligonucléotide (2) est constitué de la séquence

30 5'AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAGGAGACCAGCAGCAGCA
GCAGCAGC 3' (63 mer).

L'oligonucléotide (3), est constitué de la séquence 5'

TTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGCAGCATAATTCTCT 3' (38 mer).

L'oligonucléotide (5), est constitué de la séquence 5'

35 AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGCAGCATAATTCTCT
3' (57 mer).

L'oligonucléotide (6), est constitué de la séquence 5'

GCTGCTGCTGCTGCTGGTCTCCTTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGCAGCATAAT
TCTCT 3' (63 mer).

Les deux oligonucléotides suivant ont été utilisés pour détecter spécifiquement les produits de réaction :

5 L'oligonucléotide (A19) est constitué de la séquence 5' XTGCCATAACCATGAGTG 3'
(17 mer).

5 L'oligonucléotide (A28) est constitué de la séquence 5' XCACTCATGGTTATGGCA 3'
(17 mer).

10 Les oligonucléotides (A28) et (A19) sont couplés en 5' à la peroxydase de rafort (X) selon un procédé précédemment décrit dans le brevet WO 91/19812.

10 L'oligonucléotide suivant a été utilisé comme agent de capture spécifique :

10 L'oligonucléotide (A25) est constitué de la séquence 3' TCTCTTAATACGTCACG 5'
(17 mer).

15 Les réactions d'hybridation impliquées dans l'exemple 1 sont les réactions 1, 2, et 3 décrites Figure 2.

15 Toutes les réactions contiennent, dans un volume final de 20 μ l après addition de l'enzyme, des oligonucléotides chacun à la concentration de 1 pmole μ l, dans un tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9 à 25°C. Trois réactions différentes sont préparées (Fig. 2). La réaction 1 comprend l'oligonucléotide 6 et l'oligonucléotide 2. La réaction 2 comprend l'oligonucléotide 1, l'oligonucléotide 3 et l'oligonucléotide 2. La réaction 3 comprend l'oligonucléotide 1, l'oligonucléotide 5 et l'oligonucléotide 2. Avant addition de l'enzyme de restriction, les essais, de volume égal à 18 μ l, sont incubés à 95°C pendant 5 minutes, puis refroidis progressivement en 15 minutes à température ambiante. Après pré-incubation 1 minute à 55°C, 10 unité de l'enzyme de restriction *Bsa* I (Biolabs) sont ajoutées dans un volume de 2 μ l, ce qui porte le volume final de chaque réaction à 20 μ l. Pour chaque réaction un contrôle sans enzyme *Bsa* I est effectué. Les réactions sont incubées à 55°C pendant 60 minutes, puis sont arrêtées par congélation à -20°C.

20 30 Les produits réactionnels sont étudiés sur gels de polyacrylamide, dénaturant ou non dénaturant, préparés selon la méthode décrite par Sambrook et al., Molecular Cloning, 1982. Les gels non dénaturant sont formés par polymérisation d'une solution contenant 15% d'acrylamide, 0,26% bisacrylamide, 0,6% persulfate d'ammonium, 90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8,3, en présence de 1% TEMED, alors que les gels dénaturants contiennent de plus de l'urée à la concentration 7M. Les gels ont une épaisseur de 1 mm et ont été coulés dans les appareils d'électrophorèse "mini-protean II electrophoresis cell" de chez Biorad.

35 40 Les échantillons analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant sont préparés par mélange de 5 μ l d'échantillon, 4 μ l d'eau distillée, et 2 μ l d'une solution 0,25% xylène cyanol, 0,25% bleu de bromophénol et 30% glycérol. Les échantillons analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant sont préparés par mélange de 5 μ l d'échantillon et de 5 μ l d'une solution 0,035% xylène cyanol, 0,035% bleu de bromophénol, 1 mM EDTA, 10M urée. Juste avant dépôt sur gel, ces échantillons sont dénaturés à 65°C pendant 2 minutes, puis refroidis rapidement dans la glace. L'électrophorèse est effectuée à 150 volt,

jusqu'à ce que le bleu de bromophénol migre à 1 cm du bas du gel. Les gels sont alors colorés pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'ethydiium à 0,6 μ g/ml, et photographiés sur une table UV grâce à un appareil polaroid.

5 Les gels non dénaturant sont plongés dans l'eau bouillante pendant 5 minutes avant transfert. Le transfert des échantillons sur membrane Hybond N de chez Amersham est effectué dans un appareil "mini trans-blot electrophoretic transfert cell" de chez Biorad, en tampon 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8,3, à 4°C, sous un champ électrique de 35,5 volt . heure . cm-1. Les filtres sont ensuite séchés durant 5 minutes à 80°C, puis les acides nucléiques sont fixés sur la membrane par exposition aux rayonnements UV durant 3 minutes .

10 Les membranes sont pré-hybridées par incubation à 37°C pendant 60 minutes dans 4 ml de tampon de phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0, chlorure de sodium 0,5M, EDTA 1 mM, SDS 0,65%, ADN de saumon 0,14 mg/ml, et polyéthylène glycol 6000 2%. L'hybridation est effectuée par incubation durant 60 minutes à 37°C dans 5 ml du même tampon contenant, à la concentration de 200 ng/ml, soit l'oligonucléotide (A19) marqué à la peroxydase de raifort, soit 15 l'oligonucléotide (A28) marqué à la peroxydase de raifort. Après 3 lavages de 30 secondes dans 50 ml de tampon PBS IX (Sambrook et al., Molecular Cloning, 1982) contenant 0,5 % Tween 20, l'oligonucléotide hybridé est révélé par l'activité de la peroxydase en présence de 10 mg de diaminobenzidine tétrachlorhydrate dihydrate dans 20 ml de tampon de phosphate de sodium 20 mM pH 7,2, chlorure de sodium 150 mM, albumine de sérum de bovin 2 mg/ml. Après 20 incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 minutes, la réaction est stoppée par rinçage à l'eau distillée.

25 Les Figures 3 et 4 montrent les résultats obtenus sur les différents essais. Les Figures 3A et 4A sont des photographies de gels d'acrylamide colorés au bromure d'ethydiium. La Figure 3A correspond à un gel non dénaturant. La Figure 4A correspond à un gel dénaturant. Les Figures 3B, 3C, 4B, et 4C sont des membranes d'électrotransfert de gels tels que ceux présentés en Figures A, analysées par hybridation avec des sondes nucléiques marquées à la peroxydase, puis révélation des sondes hybridées par réaction colorée. Les Figures 3B et 3C correspondent à un électrotransfert sur un gel non dénaturant. Les Figures 4B et 4C correspondent à un 30 électrotransfert sur un gel dénaturant. Les membranes présentées Figures 3B et 4B ont été hybridées avec la sonde oligonucléotidique (A19) marquée à la peroxydase. Les membranes présentées Figures 3C et 4C ont été hybridées avec la sonde oligonucléotidique (A28) marquée à la peroxydase. Ligne 1: contrôle sans Bsa I de la réaction 1. Ligne 2: réaction 1 en présence de 10 unités de Bsa I. Ligne 3: contrôle sans Bsa I de la réaction 2. Ligne 4: réaction 2 en présence 35 de 10 unités de Bsa I. Ligne 5: contrôle sans Bsa I de la réaction 3. Ligne 6: réaction 3 en présence de 10 unités de Bsa I. Ligne 7: oligonucléotide (1). Ligne 8: oligonucléotide (2). Ligne 9: oligonucléotide (3). Ligne 10: oligonucléotide (5).

40 La Figure 3A et la Figure 4A montrent que par électrophorèse sur gel d'acrylamide non dénaturant ou dénaturant, et coloration au bromure d'ethydiium, de nouvelles bandes apparaissent lorsque les ADN sont incubés en présence de Bsa I, par rapport à ceux incubés en l'absence de

Bsa I L'intensité des bandes qui apparaissent dans la réaction 1 est d'environ 30% de l'intensité de la bande initiale. L'intensité des bandes qui apparaissent dans la réaction 2 et dans la réaction 3 est d'environ 30% par rapport à l'intensité des bandes qui apparaissent dans la réaction 1. Les bandes qui apparaissent dans la réaction 2, ont, comme attendu, la même mobilité électrophorétique que les bandes apparaissant dans la réaction 1. Par électrotransfert et hybridation avec les sondes oligonucléotidiques (A19) et (A28) (Figures 3B, 3C, 4B, 4C), on montre que les bandes qui apparaissent dans la réaction 2, possèdent, comme attendu, les mêmes capacités d'hybridation avec (A19) et (A28) que les bandes apparaissant dans la réaction 1. Le plus petit des fragments d'ADN apparaissant par digestion par la *Bsa I* dans la réaction 3, montre, comme attendu, la même mobilité électrophorétique que le plus petit des fragments apparaissant dans la réaction 1 et n'hybridant avec aucune des deux sondes (A19) et (A28). Le deuxième fragment apparaissant dans la réaction 3 possède une mobilité électrophorétique imprédictible à cause de la queue nucléotidique simple brin, qui apparaît être légèrement inférieure à celle du complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (6).

Ces résultats permettent de conclure que, par rapport à la réaction 1 sur double brin d'ADN continu (ligne 1 et 2), la réaction 2 sur ADN double brin ne possédant pas de liaison phosphate au niveau du site de coupure le plus proche du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bsa I* (ligne 3 et 4), et la réaction 3 sur ADN double brin portant une queue nucléotidique s'initiant au niveau du site de coupure le plus proche du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bsa I* (ligne 5 et 6), possèdent une efficacité d'environ 30% (ligne 5 et 6). Comme l'efficacité de coupure de *Bsa I* dans la réaction 1 peut être estimée à 30%, l'efficacité dans la réaction 2 ou 3 peut être estimée à environ 10%.

Exemple 2:

Dans cet exemple, la coupure par l'enzyme de restriction *Bsa I* a été étudiée sur les mêmes complexes que ceux utilisés dans l'exemple 1, mais fixés de façon passive sur les parois d'un puits de plaque de microtitration.

Oligonucléotides utilisés :

Les oligonucléotides utilisés pour cet exemple ont déjà tous été décrits dans l'exemple 1.

Les réactions d'hybridation qui interviennent dans cet exemple sont les réactions 1, 2, et 3 décrites Figure 2.

L'oligonucléotide (2) est substitué en position 3' avec une fonction amine primaire selon la méthode décrite par Asseline et al. (1990) *Tetrahedron Lett.* 31, 81-84. Cette fonction amine permettra la fixation sur microplaqué. Cet oligonucléotide est hybridé soit avec l'oligonucléotide (1), soit avec l'oligonucléotide (6), par incubation à 37°C pendant 60 minutes en tampon PBS 3X décrit dans le brevet FR 9109057, en présence des oligonucléotides concernés à la concentration de 1 μ M. Le complexe d'oligonucléotide ainsi formé est fixé de façon passive sur les puits d'une plaque de microtitration Nunc-Immuno plate de Maxisorp selon la méthode déjà décrite dans le brevet FR 9109057, permettant la fixation d'environ 5 pmoles du complexe sur un puits. Après

fixation, trois lavages avec du tampon PBS Tween 1X sont effectués. Un dernier lavage en tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9, qui correspond au tampon d'activité maximale de *Bsa* I, est ensuite réalisé. Pour la réaction 1, on ajoute dans le puits où est adsorbé le complexe oligonucléotide (2)-oligonucléotide (6), 100 µl du tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9, sans oligonucléotide. Pour la réaction 2, 5 pmoles d'oligonucléotide (3) sont ajoutés dans un volume final de 100 µl de tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9, dans les puits où est adsorbé le complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (1). Pour la réaction 3, l'oligonucléotide (5) est ajouté à la même concentration et dans le même tampon, dans des puits équivalents. Après préincubation 5 minutes dans une étuve à 55°C, 50 unités de *Bsa* I sont additionnées sous un volume de 10 µl. Pour chaque réaction, un contrôle sans addition de *Bsa* I est effectué. Les réactions sont réalisées par incubation à 55°C pendant 60 minutes puis sont arrêtées par addition d'EDTA à la concentration finale de 25 mM.

La quantité de fragment de restriction relargué dans le milieu a été estimée par la technique de détection précédemment décrite dans le brevet FR 91 09057. Un volume de 70 µl de la réaction est transféré dans un tube eppendorf, où les acides nucléiques contenus dans cet échantillon sont dénaturés par addition de 7 µl d'hydroxyde de sodium 2M à température ambiante, et neutralisés après 3 minutes par addition de 7 µl d'acide acétique 2M. Pour contrôle et étalonnage, deux gammes de dilution d'oligonucléotide sont effectuées, l'une de l'oligonucléotide (2), l'autre du complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (6). Les échantillons sont alors déposés dans le puits d'une plaque de microtitration dans lequel a été préalablement fixée la sonde oligonucléotidique de capture (A25). On dépose soit 50 µl d'échantillon non dilué, soit le même volume d'échantillon dilué au 10ème ou au 100ème. Immédiatement, la sonde oligonucléotidique de détection (A28) couplée à la peroxydase de raifort est ajoutée dans un volume de 50 µl de tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 7,0, chlorure de sodium 1M, EDTA 2 mM, SDS 1,3%, ADN de saumon 0,24 mg/ml, polyéthylène glycol 6000 4%. Après incubation 60 minutes à 37°C, les puits sont lavés au PBS Tween 1X. La révélation de la sonde A28-peroxydase hybridée sur le fragment de restriction de l'oligonucléotide (2) est effectuée par addition de 100 µl d'une solution contenant le substrat ortho-phénylène diamine. La réaction colorimétrique est arrêtée après 20 minutes par addition de 100 µl d'acide sulfurique 1M. La densité optique à 492 nm est lue grâce à un lecteur AXIA microreader (bioMérieux).

Les résultats (tableau 1) obtenus sur les gammes de dilution de l'oligonucléotide (2) et du complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (6) montrent que la réhybridation des deux oligonucléotides après dénaturation affaiblit le signal. Le signal des produits des réactions 1, 2 et 3 doit donc être comparé au signal du complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (6). Les valeurs mesurées montrent que environ 1,5 pmoles de région 5' de l'oligonucléotide (2) sont libérées par la digestion de 5 pmoles de complexe oligonucléotide (2)/oligonucléotide (6) dans la réaction 1. L'efficacité de coupure de l'enzyme de restriction *Bsa* I sur double brin d'ADN continu fixé sur support solide est donc d'environ 30% dans ces conditions. Ce résultat est

comparable à l'efficacité de coupure sur le même complexe en solution. L'efficacité de digestion pour la réaction 2 sur ADN double brin fixé sur phase solide, ne possédant pas de liaison phosphate au niveau du site de coupure le plus proche du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bsa* I et l'efficacité de digestion pour la réaction 3 sur ADN double brin fixé sur phase solide portant une queue nucléotidique s'initiant au niveau du site de coupure le plus proche du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *Bsa* I est environ 3 fois moindre que pour la réaction 1. Pour ces deux derniers complexes fixés sur phase solides, l'efficacité de digestion par la *Bsa* I est donc d'environ 10%, ce qui correspond à l'efficacité de digestion de la même enzyme sur les mêmes complexes en solution.

10

TABLEAU 1

15

20

25

30

		DO à 492 nm		
		50 µl	5 µl	0,5 µl
réaction 1	0 U <i>Bsa</i> I	0	0	0
	10 U <i>Bsa</i> I	>2	0,6	0
réaction 2	0 U <i>Bsa</i> I	0	0	0
	10 U <i>Bsa</i> I	1,8	0,2	0
réaction 3	0 U <i>Bsa</i> I	0	0	0
	10 U <i>Bsa</i> I	2,0	0,2	0
oligo (2)	50 pmoles	>2	>2	>2
	5 pmoles	>2	>2	1,7
	0,5 pmoles	>2	1,6	0,2
	0,05 pmoles	1,5	0,2	0
	(6) 50 pmoles	>2	>2	1,8
	(6) 5 pmoles	>2	1,7	0,2
	(6) 0,5 pmoles	1,9	0,2	0
	(6) 0,05 pmoles	0,5	0	0

Exemple 3 :

La méthode d'amplification sur support solide peut être mise en oeuvre selon le protocole suivant:

Oligonucléotides utilisés :

Les oligonucléotides décrits pour l'exemple 1 sont utilisés pour cet exemple. Un oligonucléotide supplémentaire intervient:

L'oligonucléotide (7) est constitué de la séquence

5'ATAAGGAGACCAGCAGCAGCAGCAGC3' (29 mer).

Les réactions d'hybridation impliquées dans cet exemple sont les réactions 2, 3 et 4 décrites Figure 2.

5 L'oligonucléotide (2), substitué en position 3' avec une fonction amine primaire, est hybridé avec l'oligonucléotide (1) comme décrit dans l'exemple 2. De la même façon, l'oligonucléotide (7) est substitué en position 3' avec une fonction amine primaire, et hybridé avec l'oligonucléotide (6). Ces deux complexes d'oligonucléotides sont alors fixés de façon passive sur les mêmes puits d'une plaque de microtitration comme décrit dans l'exemple 2. De même que dans l'exemple 2, trois lavages en PBS Tween 1X sont effectués, suivis d'un dernier lavage en tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9. On ajoute alors dans chaque puits différentes concentrations de l'oligonucléotide (5), qui mime la séquence cible dont on veut mettre en évidence la présence dans un échantillon. Le volume final de la réaction est de 100 µl, dans un tampon 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT, pH 7,9. De même que dans l'exemple 2, 50 unités de *Bsa* I sont ajoutées sous un volume de 10 µl après pré-incubation durant 5 minutes dans une étuve à 55°C. Pour chaque réaction, un contrôle sans addition de *Bsa* I est effectué. Les réactions sont incubées à 55°C pendant 3 heures et sont arrêtées par addition d'EDTA à la concentration finale de 25 mM.

10 15 La quantité de fragment de restriction relargué dans le milieu est estimée, comme dans l'exemple 2, par la technique de détection précédemment décrite dans le brevet FR 91 09057: un certain volume réactionnel est prélevé, dénaturé à pH alcalin, le pH est neutralisé, et 50 µl d'échantillons à différentes dilutions sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration sur les parois desquelles est fixé l'oligonucléotide de capture (A25). La sonde de détection oligonucléotidique (A28) couplée à la peroxydase est ajoutée, et, après incubation, et lavage, la sonde (A28)-peroxydase hybridée sur le fragment de restriction de l'oligonucléotide (2) est révélée par réaction avec l'ortho-phénylène diamine, et la densité optique à 492 nm est mesurée.

20 25 30 35 En introduisant dans la réaction 5 pmoles de l'oligonucléotide cible (5), la totalité des 5 pmoles de complexe oligonucléotide (1)/oligonucléotide (2) de capture subit une restriction d'environ 10% des molécules. Le signal obtenu est égal au signal produit par 0,5 pmoles d'oligonucléotide (2) et d'oligonucléotide (6). La méthode produit au moins 10 fois plus de complexe oligonucléotide (1)/oligonucléotide (2) coupé que de cible introduite dans le milieu, puisque l'introduction de 0,5 pmoles d'oligonucléotide cible (5) produit le même signal maximum. De plus, la méthode produit au moins 100 fois plus de complexe oligonucléotide (1)/oligonucléotide (2) coupé que de cible introduite dans le milieu, puisque l'introduction de 0,05 pmoles d'oligonucléotide cible (5) produit le même signal maximum. La méthode produit même au moins 1000 fois plus de complexe oligonucléotide (1)/oligonucléotide (2) coupé que de cible introduite dans le milieu, puisque l'introduction de 0,005 pmoles d'oligonucléotide cible (5) produit le même signal maximum. L'introduction de 0,0005 pmoles de cible oligonucléotide (5) induit un signal deux fois plus faible que le signal maximum, ce qui prouve qu'en fait l'amplification du nombre de complexes oligonucléotide (1)/oligonucléotide (2) coupés par rapport au nombre de molécules cibles est d'un facteur $5 \cdot 10^3$.

TABLEAU 2

		DO à 492 nm		
		non dilué	1/10	1/100
concentrations d'oligonucléotide (5) pmoles/50 µl	0	0	0	0
	5	1,9	0,2	0
	0,5	1,9	0,2	0
	0,05	1,9	0,2	0
	0,005	1,9	0,2	0
	0,0005	0,9	0,1	0
concentration d'oligonucléotide (2) + (6) pmoles/50 µl	50	>2	>2	1,8
	5	>2	1,7	0,2
	0,5	1,9	0,2	0
	0,05	0,5	0	0

REVENDICATIONS

1. Système de détection d'une séquence d'acide nucléique cible selon une méthode d'amplification par restriction enzymatique, caractérisé en ce qu'il comprend un ensemble de deux sondes nucléiques (1,2) partiellement double brin fixées sur un support solide (3), lesdites sondes comprenant un premier brin qui contient la séquence du site de reconnaissance d'une endonucléase et qui s'étend jusqu'au site de coupure dudit premier brin par ladite endonucléase, et un second brin comprenant une partie complémentaire dudit premier brin s'étendant depuis au moins ledit site de reconnaissance jusqu'au site de coupure du premier brin, ce second brin se prolongeant au-delà dudit site de coupure par une partie simple brin, ladite partie simple brin étant, pour l'une des sondes (ou première sonde) (1) sensiblement complémentaire de la séquence d'acide nucléique cible, et pour l'autre sonde (ou seconde sonde) (2) sensiblement complémentaire, et de préférence parfaitement complémentaire du produit de clivage simple brin de ladite première sonde par ladite endonucléase, lesdites parties simple brin desdites sondes ayant une extrémité libre 3' pour l'une des sondes et 5' pour l'autre sonde, et ladite endonucléase étant une endonucléase de restriction de type II à site de fixation double brin et à coupure protubérante, et dont le site de clivage est situé à l'extérieur du site de reconnaissance.
5
2. Système de détection selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la partie monobrin desdites sondes comporte au moins 6 nucléotides.
10
3. Système selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que la partie monobrin desdites sondes comporte au plus 100 nucléotides.
15
4. Procédé pour détecter la présence d'une séquence d'acide nucléique cible dans un échantillon, en milieu liquide, caractérisé en ce qu'il comprend :
 - la mise en contact de l'échantillon avec le système de sondes (1,2) tel que défini dans
 - 25 l'une quelconque des revendications 1 à 3, et avec l'endonucléase,
 - l'incubation à une température appropriée pendant un temps suffisant pour permettre le recyclage des fragments clivés par l'endonucléase jusqu'à l'obtention du taux d'amplification souhaité,
 - et la détection, selon les méthodes usuelles, du clivage des sondes de capture résultant
 - 30 de l'hybridation de la séquence cible lorsque celle-ci était présente dans l'échantillon.
5. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on opère à une température constante, voisine de la température d'activité optimale de ladite endonucléase.
35

1/4

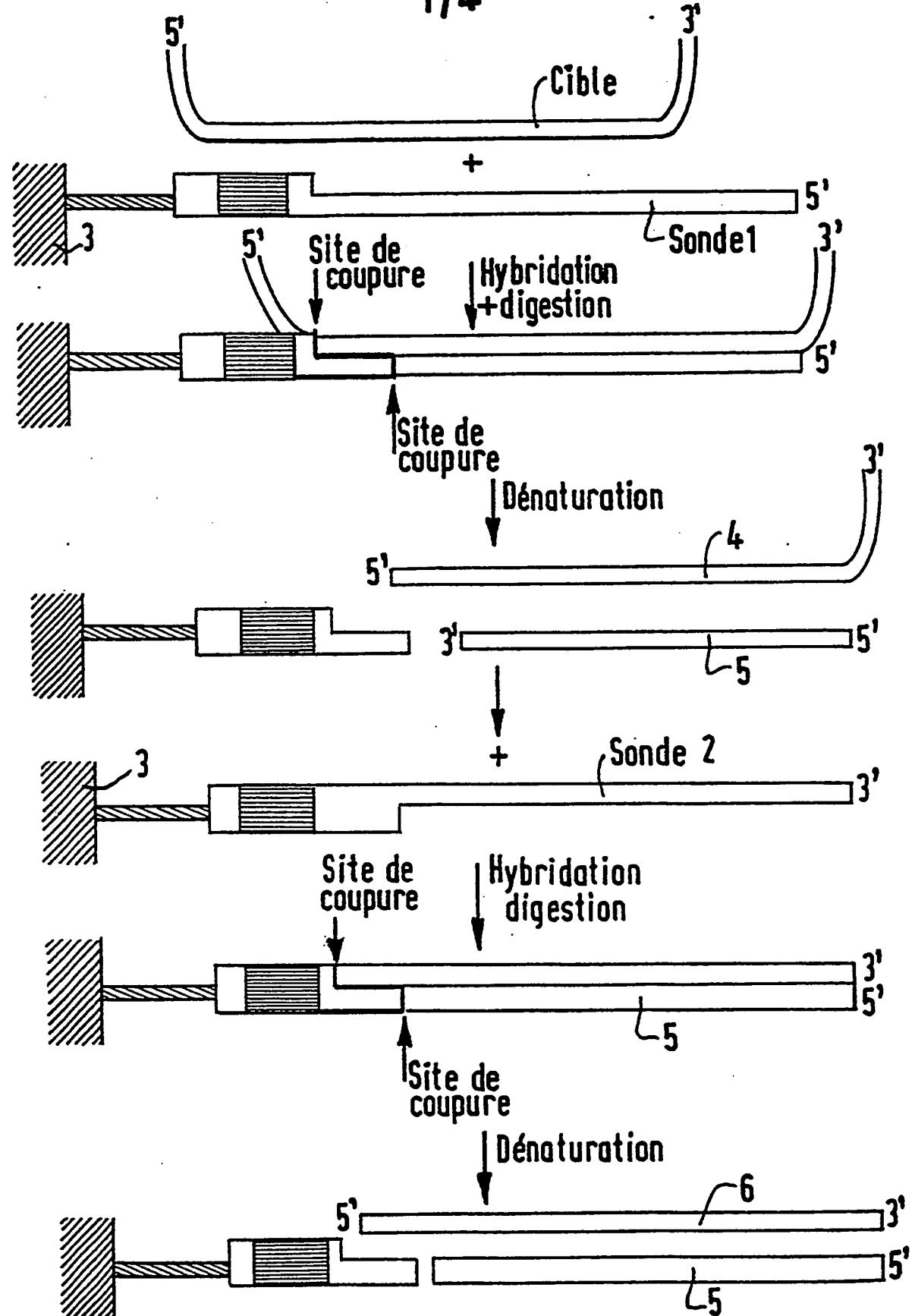


FIG.1

2/4

FIG. 2

Réaction 1:

site de coupure ↓

(2) 5' AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAGGAGACCAGCAGCAGCAGCAGC3'

(6) 3' TCTCTTAATACGTACGACGGTATTGGTACTCACTATTCCTCTGGTCGTCGTCGTCGTCG5'

↑ site de reconnaissance

Réaction 2:

↓

(2) 5' AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAGGAGACCAGCAGCAGCAGCAGC3'

(1) 3' CCTCTGGTCGTCGTCGTCGTCG5'

(3) 3' TCTCTTAATACGTACGACGGTATTGGTACTCACTATT5'

Réaction 3:

↓

(2) 5' AGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAGGAGACCAGCAGCAGCAGCAGC3'

(1) 3' CCTCTGGTCGTCGTCGTCGTCG5'

(5) 3' TCTCTTAATACGTACGACGGTATTGGTACTCACTATTCACTGGGCCACTTACTT5'

Réaction 4:

(7) 5' ATAAGGAGACCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC3'

(6) 3' TCTCTTAATACGTACGACGGTATTGGTACTCACTATTCCTCTGGTCGTCGTCGTCG5'

↑

Sondes nucléiques:

(A19) 5' XTGCCATAACCATGAGTG3'

(A28) 3' ACGGTATTGGTACTCACT5'

3' TCTCTTAATACGTACG5' (A25)

3/4

FIG. 3

Fig. 3A

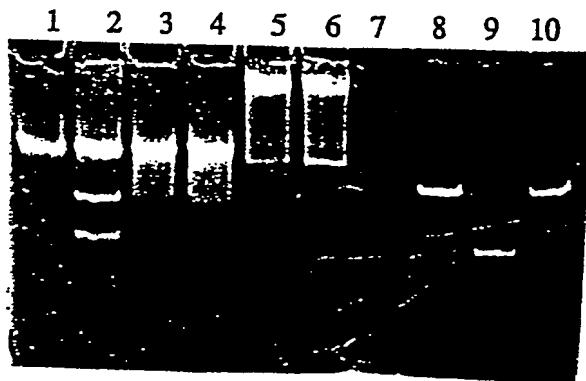


Fig. 3B

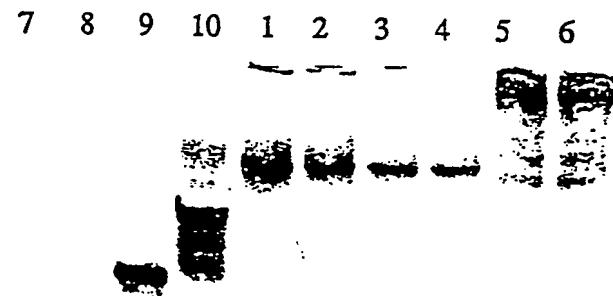


Fig. 3C

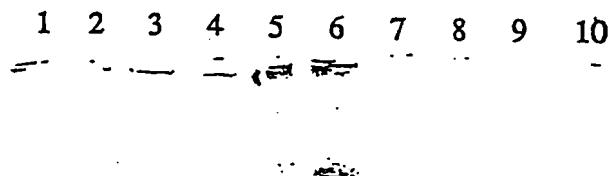


FIG. 4

Fig. 4A

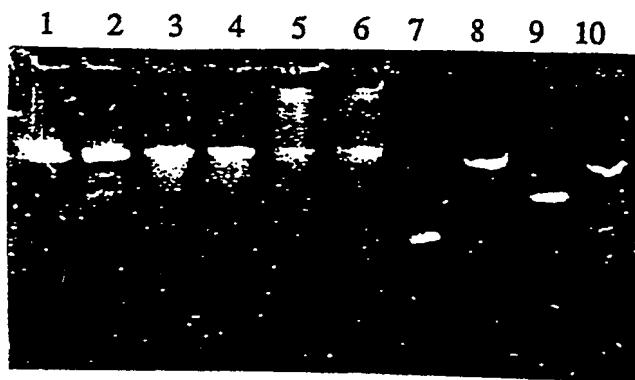


Fig. 4B

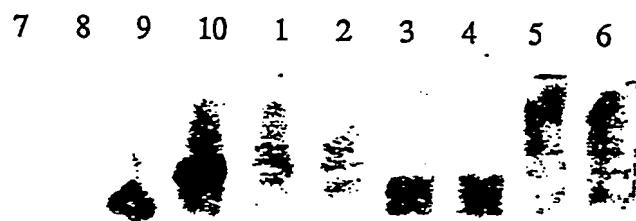


Fig. 4C



RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2697851

N° d'enregistrement
nationalFR 9213562
FA 478395

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	EP-A-0 455 517 (ONCOR) ---	-
A	WO-A-8 910 415 (MEIOGENICS) ---	-
A	EP-A-0 142 299 (FUJIREBIO K. K.) ---	-
A	WO-A-9 117 264 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) ---	-
A	WO-A-8 504 674 (LIFE TECHNOLOGIES) -----	-
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
C12Q		
1		
	Date d'achèvement de la recherche 07 JUILLET 1993	Examinateur MOLINA GALAN E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		